

PROSIDING

SEMINAR NASIONAL DAN KONGRES INDONESIAN PROTEIN SOCIETY (IPS)

Jember, 6–7 Juli 2012

Tema:

**Eksplorasi dan Inovasi Sumber Protein
untuk Penguatan Sains dan Teknologi**

Editor:

Dr. Ir. Miswar, M.Si.

Netty Ermawaty, SP., M.Sc, Ph.D.

Tri Handoyo, SP., Ph.D

PROSIDING

SEMINAR NASIONAL DAN KONGRES INDOONESIAN PROTEIN SOCIETY (IPS)

Tema: Eksplorasi dan Inovasi Sumber Protein untuk Penguatan Sains dan Teknologi

Jember, 6–7 Juli 2012

Editor Dr. Ir. Miswar, M.Si.
Netty Ermawaty, SP., M.Sc., Ph.D.
Tri Handoyo, SP., Ph.D.

ISBN 978-979-803684-2

Penerbit



Kartika Mulya (Anggota IKAPI)
Jl. Potro Agung III No. 41C, Surabaya 60135
Tel. (031) 3715941, Fax. (031) 3770687
email: kartikamulya@gmail.com



UNIVERSITAS JEMBER



Indonesian Protein Society

Hak cipta dilindungi undang-undang.

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian/seluruh isi buku ini
tanpa izin tertulis dari penerbit

KATA PENGANTAR

Seminar Nasional dan Kongres Indonesian Protein Society merupakan forum ilmiah yang diselenggarakan oleh Universitas Jember bekerja sama dengan Organisasi profesi *Indonesian Protein Society* (IPS) pada tanggal 6-7 Juli 2012 di Jember. Seminar Nasional IPS dengan tema “Eksplorasi dan Inovasi Sumber Protein Untuk Penguatan Sains dan Teknologi” dimaksudkan sebagai sarana dalam pengembangan keilmuan dan informasi bagi peneliti dibidang protein dari semua aspek ilmu hayati.

Seminar ini menghadirkan beberapa pembicara tamu dari luar dan dalam negeri, antara lain Prof. Dr. Kyun Oh Lee (Korea), Prof. Dr. Young Ryun Chung (Korea), Prof. Dr. Sang Yeol Lee (Korea) Prof. Dr. Toshiharu Hase (Japan), Prof. Tomohiko Yamazaki (Japan), Prof. Dr. Nico Tjandra (USA), Prof. Dr. Maggy T. (IPB) dan Prof. Dr. Bambang Sugiharto (Univ. Jember), serta dihadiri oleh peneliti-peneliti dari berbagai institusi di Indonesia.

Makalah-makalah yang diseminarkan dan terangkum dalam prosiding ini terbagi dalam 3 bidang yaitu Bidang Pertanian dan Pangan, Bidang Kesehatan dan Farmasi serta Bidang Lingkungan dan Industri. Tim editor dalam menyusun prosiding ini tidak mengubah isi makalah, dan hanya melakukan beberapa penyesuaian menurut format redaksional yang telah ditetapkan. Adapun isi dari setiap makalah menjadi tanggung jawab masing-masing penulis.

Kami berharap semoga prosiding ini bermanfaat dan dapat menambah khasanah dalam pengembangan dan penerapan ilmu di bidang protein untuk kemakmuran dan kesejahteraan umat manusia.

Jember, Februari 2013

Tim Editor

Dr. Ir. Miswar, M.Si

Netty Ermawaty, SP., M.Sc, Ph.D

Tri Handoyo, SP., Ph.D.

DAFTAR ISI

	Halaman
Kata Pengantar	iii
Daftar Isi	iv
Sambutan Ketua Panitia	viii
Sambutan Ketua IPS	ix
Sambutan Rektor Universitas Jember	x
Molecular Machineries for Photosynthetic Bio-Assimilation in Ferredoxin-Dependent Redox Metabolisms Toshiharu Hase	1
Molecular Properties of Redox-Chaperones and Their Physiological Roles Against External Stresses in Eukaryotic Cells Kyun Oh Lee and Sang Yeol Lee	3
N-Glycan Modification and Plant Development Kyun Oh Lee, Rikno Harmoko, Wahyu Indra Dwi Fanata, and Sang Yeol Lee	4
Structural Study Of Actin Cytoskeleton Regulation Nico Tjandra	5
Protein and Peptide Bioactive Maggy Thenawidjaja Suhartono	6
Having Future Sweet with Sucrose-Phosphate Synthase and Sucrose-Transporter Protein Bambang Sugiharto	8
Application of Protein Engineering to Biosensors Tomohiko Yamazaki	10
BIDANG PERTANIAN PANGAN	
Upaya Peningkatan Produksi dan Kualitas Tanaman Jagung Lokal Madura Melalui Seleksi Daur Ulang Fenotipe Sri Hartatik dan Zahratus Sakdijah	13
Pembuatan Antibodi Poliklonal Menggunakan Antigen Protein Rekombinan <i>Sucrose Transporter</i> (sut1) Popy Hartatie Hardjo, Nurul Holifah, Triliani Farlisa, Tri Handoyo, dan Bambang Sugiharto	19
Analisis lokasi gen carbonic anhydrase (MVFACS, MAFACS dan LVFACS) pada <i>Flaveria bidentis</i> Didik Pudji Restanto	24
Peranan <i>Synechococcus</i> sp. sebagai biofertilizer untuk meningkatkan kadar protein biji tanaman kedelai (<i>Glycine max</i> L. Merrill) R. Soedradjad dan Anang Syamsunhar	28

Formulasi <i>Filler</i> dan Uji Kinerja Enzim Bromelin untuk Pengempuk Daging (<i>Meat Tenderizer</i>) Ika Rahmatul Layly, Deden Rosid Waltam, Ayi Mufti dan Ruby Setiawan	113
Pengujian Nilai Kualitas Protein Hidrolisat Kacang Hijau dengan Metode NPU (<i>Net Protein Utilization</i>) Secara <i>In Vivo</i> Galih Kusuma Aji, Noer Lally, Alit Pangestu, Sri Peni Wijayanti, dan Fajarwati Utami	121
Metode Sterilisasi Permukaan Yang Murah Untuk Eksplan Daun Majegau (<i>Dysoxylum caudostachyum</i> Miq.) Pada Kultur <i>In Vitro</i> Novi Harun AR	127
DEPARTEMEN KESEHATAN DAN FARMASI	
Cloning And <i>In Vitro</i> Antimycobacterial Activity Of Lectin Protein in Combination with Streptomycin To Increase Sensitivity Against <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Ahyar Ahmad and Muh. Nasrum Masi	135
Isolasi dan Karakterisasi Protein Bioaktif dari Beberapa Jenis Spons sebagai Agent Antimikroba Audi Ilham Latunra dan Ahyar Ahmad	145
Spesifisitas Antibodi <i>hP-116kDa</i> Hasil Induksi Protein Non Kinase Membran Spermatozoa Manusia Pada Jaringan Somatik dan Reproduksi Manusia Umie Lestari	150
Identifikasi Protein Spesifik <i>Insulin-Like Growth Factors (IGFs)</i> pada Ayam Broiler sebagai Bahan Bioaktif Rosa Tri Hertamawati	155
Kajian Potensi Alergenisitas Nira Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) NX1 4T dan NX1 6T Melalui Uji Praklinik Pada Hewan Coba Tikus Putih Nurmalasari, Natalia Tri Astuti, Agus Heri Setyo Wahyudi, Herra Studlawan, Tutik Sri Wahyuni	162
POSTER: Structure of 3-Ketosteroid Δ^1 -Dehydrogenase From <i>Rhodococcus erythropolis</i> SQ1: Where Pad Meets Tyrosines Ali Rohman, Niels van Oosterwijk and Bauke W. Dijkstra	168
Respon Antibodi Manusia terhadap Protein Salivary Gland (SG) <i>Aedes aegypti</i> Berpotensi sebagai Indikator Resistensi terhadap Demam Berdarah (DBD) Rike Oktarianti, Syubbanul Wathon, Dwi Esti F dan Kartika Senjarini	169
Efek Penghambatan Ekstrak Kelenjar Saliva Nyamuk Anopheles terhadap Derajat Parasitemia pada Mencit Model Untuk Malaria Yunita Armiyanti, Ina Soraya, Vinny dan Kartika Senjarini	176
Kajian Protein Alergi dan Fisiologi Biji Kakao Selama Proses Pra-Perkecambahan Tri Handoyo, Mega Kartika Suri, , Irwan Sadiman, Denna Eriani	183
Analisis Bioinformatika Motif Residu Lestari Domain $(\beta/\alpha)_5$ -Barrel GH51 A-L-Arabinofuranosidase Yang Berperan Pada Spesifitas Substrat Melalui Interaksi Sidik Jari Gugus Arabinofuranosil Much Zaenal Fanani, One Asmarani, Hery Suwito, Ni Nyoman Tri Puspaningsih	188
Isolasi Gen Pengkode Protein Antioksidan (AOP) pada Biji Melinjo (<i>Gnetum gnemon</i>) Arya Bagus Boedi Iswanto dan Tri Agus Siswoyo	193

Identifikasi Protein Spermatozoa dan Cairan Lumen pada Epididimis Sapi, Kaitannya dengan Maturasi Spermatozoa Mahrani dan Della Ratna Kartini	196
Diskriminasi Daun Gandarusa (<i>Justicia gendarussa</i> Burm.f.) Asal Surabaya, Jember dan Mojokerto Menggunakan Metode Elektroforesis Moch. Amrus Hidayat, Tri Handoyo dan Bambang Prajogo E.W.	205
Peningkatan Kemampuan Antioksidan Pada Biji Melinjo (<i>Gnetum Gnetum</i>) dengan Metode Enzimatik Tri Agus Siswoyo	210
Skrining Enzim Fibrinolitik dari Bakteri Tanah Madaniyah, Sattya Arimurti dan Evi Umayah Ulfa	216
Transformasi Gen Sy86 dalam Vektor Ekspresi pET TOPO 200 untuk Mendapatkan Protein Rekombinan sY86 Evi Hanzar	222
Aktivitas Trombolitik dan Antikoagulan Ekstrak Jamur Tiram Putih (<i>Pleoturus ostratus</i>) Secara <i>In Vitro</i> Khilwiyah Eka Putri, Evi Umayah Ulfa dan Sattya Arimurti	226
Isolasi Bakteri Penghasil dan Karakterisasi Enzim Dekstranase Miswar	233
IZANG LINGKUNGAN DAN INDUSTRI	
Produksi dan Aplikasi Kitinase Dari <i>B. licheniformis</i> HSA3-1a dalam Menghidrolisis Kitin dari Limbah Udang dan Dinding Sel Jamur <i>Ganoderma</i> sp. Hasnah Natsir, Abd. Rauf Patong, Maggy T. Suhartono dan Ahyar Ahmad	239
Pembuatan Keju Kedelai (<i>Soycheese</i>) Rendah Garam dengan Menggunakan <i>Rhizopus oligosporus</i> Neny Novita Yuliany, Eka Ruriani dan Nurhayati	244
Identifikasi Tanaman Potensial Penghasil Bahan Aktif Tanin Protein Komplek untuk Penghambatan Aktivitas Alpha Amylase Asriyah Firdausi dan Tri Agus Siswoyo	251
Kloning Gen B-Endoxilase Asal Mikroorganisme dalam Abdominal Rayap A.A. Istri Ratnadewi, Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Wuriyanti Handayani dan Previta	255
Analisis <i>Scanning Electron Microscope</i> Terhadap Perubahan Struktur Permukaan Bonggol Kelapa Sawit Akibat Aktivitas Xilanase Dan Selulase Anita Kurniati dan Ni Nyoman Tri Puspaningsih	263
Profil Aktivitas Xilanase dalam Ionik Liquid Ika Oktavianuwati	267
Skrining Bakteri Xilanolitik Asal Kulit Buah Kakao Esti Utarti, Audiananti Meganandi Kartini dan Sattya Arimurti	271
Optimasi Ekstraksi Enzim Bromelin Berbahan Dasar Limbah Nanas Lokal Subang Ika Rahmatul Layly, Deden Rosid Waltam, Ayi Mufti dan Ruby Setiawan	279

Efektifitas Transformasi Gen *SoSPS1* (*Sucrose Phosphate Synthase*) Menggunakan Agen Seleksi Kanamycin Dan Phosphinothricin Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.)

Aji Baskoro⁽¹⁾, Yunianzi Tiara⁽²⁾, Didik Pudji Restanto⁽¹⁾, Tri Handoyo⁽¹⁾,
Netty Ermawati⁽³⁾, dan Bambang Sugiharto⁽²⁾

⁽¹⁾ Fakultas Pertanian-Universitas Jember

⁽²⁾ Jurusan Biologi, FMIPA-Universitas Jember

⁽³⁾ Laboratorium BIOSAIN Politeknik Negeri Jember

Corresponding author: bbsghrt@yahoo.com

Abstrak

Transformasi gen merupakan salah satu teknik dalam bidang rekayasa genetika yang digunakan untuk memasukkan gen asing kedalam genom tanaman. Keberhasilan dari proses ini ditentukan oleh beberapa hal, salah satunya oleh gen penyeleksi (selectable marker) yang berfungsi untuk menyeleksi organ, jaringan, atau sel transforman. Untuk melihat efektifitas transformasi pada tanaman tebu, cDNA *SoSPS1* dikonstruksi pada plasmid pCL4 yang memiliki selectable marker *nptII* sebagai gen ketahanan terhadap antibiotik kanamycin dan pSMAB dengan gen bar sebagai gen ketahanan terhadap herbisida phosphinothricin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat efektifitas dari transformasi gen *SoSPS1* pada tanaman tebu dengan menggunakan antibiotik kanamycin dan herbisida phosphinothricin sebagai agen seleksi tanaman transforman.

Transformasi pada tanaman tebu menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 yang mengandung konstruk pCL4-*SoSPS1* dan pSMAB-*SoSPS1* menghasilkan perbedaan efektifitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa efektifitas transformasi gen *SoSPS1* menggunakan plasmid pCL4-*SoSPS1* sebesar 12% dan pSMAB-*SoSPS1* sebesar 2%. Hasil tersebut membuktikan bahwa transformasi gen *SoSPS1* menggunakan konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* dengan agen seleksi antibiotik kanamycin lebih efektif dibandingkan dengan dengan plasmid pSMAB-*SoSPS1* yang menggunakan herbisida phosphinothricin.

Keywords: *Transformasi gen, Selectable marker, Gen SoSPS, nptII, bar*

PENGANTAR

Transformasi genetik merupakan suatu teknik yang saat ini digunakan untuk perbaikan sifat-sifat tanaman dengan cara memasukkan gen-gen penyandi sifat-sifat unggul. Metode transformasi gen dalam perkembangan bioteknologi dapat dilakukan dengan memanfaatkan peran *Agrobacterium tumefaciens*. Transformasi gen pada tanaman dengan menggunakan *A.tumefaciens* melibatkan *gene of interest* (*goi*) sebagai gen yang dikehendaki keberadaannya pada tanaman target. Gen *SPS* (*sucrose phosphate synthase*) merupakan *goi* pada penelitian ini, gen

SPS adalah gen pengkode sintesa enzim *SPS* yang mengkatalisis reaksi pembentukan sukrosa di sitosol. Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa enzim *SPS* merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa (Huber and Huber, 1996; Laporte *et al.*, 2001).

Gen *SoSPS1* merupakan gen pengkode sintesa enzim *sucrose phosphate synthase* pada tanaman tebu yang yang dikonstruksi pada plasmid pCL4 dan pSMAB. Plasmid pCL4 memiliki *selectable marker nptII* sebagai gen

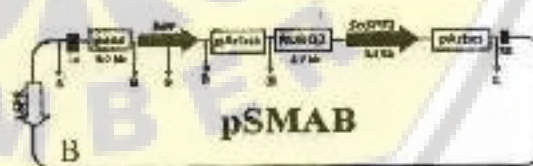
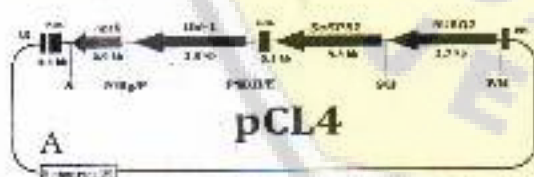
ketahanan terhadap antibiotik *kanamycin* (Liu *et al.*, 2003) dan plasmid pSMAB dengan gen *bar* sebagai gen ketahanan terhadap herbisida *phosphinothricin* (Igasaki *et al.*, 2002). Kedua konstruk plasmid tersebut memiliki promoter yang sama untuk mengendalikan ekspresi gen *SoSPSI* yaitu promoter *rice ubiquitin2* (RUBQ2) yang merupakan promoter konstitutif untuk tanaman monokotil. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efektifitas transformasi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu dengan menggunakan antibiotik *kanamycin* dan herbisida *phosphinothricin* sebagai agen seleksi tanaman transforman.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Penelitian menggunakan eksplan tunas lateral tebu varietas BL. Pengembangan dan pertumbuhan tunas lateral tebu dilakukan menggunakan metode yang telah disebutkan pada penelitian sebelumnya (Safitri dan Sugiharto, 2011). Tunas lateral tebu yang telah berkembang menjadi tanaman *in vitro* selanjutnya diisolasi bagian basalnya untuk digunakan sebagai eksplan dalam transformasi.

Optimasi Eksplan Pada Media Seleksi



Gambar 1. Konstruk Plasmid pCL4-*SoSPSI* (A) dan pSMAB-*SoSPSI*(B)

Koloni tunggal bakteri *A.tumefaciens* diambil dari YEP padat lalu ditumbuhkan pada media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik *rifampicin* 100 mgL⁻¹, *kanamycin* 50 mgL⁻¹, *gentamycin* 12,5 mgL⁻¹, untuk konstruk pCL4-*SoSPSI* dan *rifampicin* 100 mgL⁻¹, *spectinomycin* 50 mgL⁻¹ untuk konstruk pSMAB-*SoSPSI*. *A.tumefaciens* yang telah tumbuh diambil

Optimasi pertumbuhan eksplan pada media seleksi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi optimal antibiotik *kanamycin* dan herbisida *phosphinothricin* yang dibutuhkan untuk menyeleksi tanaman transforman. Periode seleksi dilakukan sebanyak 5 periode, selama 21 hari disetiap periodenya.

Konfirmasi Keberadaan Konstruk Plasmid pCL4-*SoSPSI* dan pSMAB-*SoSPSI* pada *Agrobacterium tumefaciens*

Konfirmasi konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* dan pSMAB-*SoSPSI* dilakukan untuk mengetahui keberadaan konstruk plasmid pada *Agrobacterium* sebelum digunakan pada proses transformasi. Konfirmasi diawali dengan mengisolasi DNA plasmid menggunakan metode *alkaline lysis with SDS* (Sambrook *et al.*, 1989), yang selanjutnya hasil isolasi dijadikan sebagai DNA *template* pada analisis PCR (*polymerase chain reaction*).

Transformasi gen *SoSPS*

Transformasi gen *SoSPSI* dilakukan dengan menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 yang mengandung konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* atau pSMAB-*SoSPSI* (Gambar 1).

dengan menggunakan sentrifugasi 10.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Pellet yang didapat dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam 50 ml media infeksi (MS cair pH 5,5 + *acetosyringone* 100 mgL⁻¹) dan eksplan digojog dalam media infeksi selama 30 menit dalam kondisi gelap. Setelah proses infeksi, eksplan disaring pada kertas saring steril dan

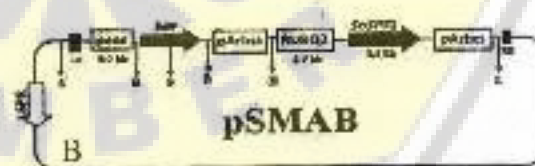
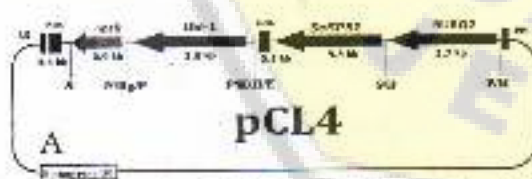
ketahanan terhadap antibiotik *kanamycin* (Liu *et al.*, 2003) dan plasmid pSMAB dengan gen *bar* sebagai gen ketahanan terhadap herbisida *phosphinothricin* (Igasaki *et al.*, 2002). Kedua konstruk plasmid tersebut memiliki promoter yang sama untuk mengendalikan ekspresi gen *SoSPSI* yaitu promoter *rice ubiquitin2* (RUBQ2) yang merupakan promoter konstitutif untuk tanaman monokotil. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efektifitas transformasi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu dengan menggunakan antibiotik *kanamycin* dan herbisida *phosphinothricin* sebagai agen seleksi tanaman transforman.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Penelitian menggunakan eksplan tunas lateral tebu varietas BL. Pengembangan dan pertumbuhan tunas lateral tebu dilakukan menggunakan metode yang telah disebutkan pada penelitian sebelumnya (Safitri dan Sugiharto, 2011). Tunas lateral tebu yang telah berkembang menjadi tanaman *in vitro* selanjutnya diisolasi bagian basalnya untuk digunakan sebagai eksplan dalam transformasi.

Optimasi Eksplan Pada Media Seleksi



Gambar 1. Konstruk Plasmid pCL4-*SoSPSI* (A) dan pSMAB-*SoSPSI*(B)

Koloni tunggal bakteri *A.tumefaciens* diambil dari YEP padat lalu ditumbuhkan pada media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik *rifampicin* 100 mgL⁻¹, *kanamycin* 50 mgL⁻¹, *gentamycin* 12.5 mgL⁻¹, untuk konstruk pCL4-*SoSPSI* dan *rifampicin* 100 mgL⁻¹, *spectinomycin* 50 mgL⁻¹ untuk konstruk pSMAB-*SoSPSI*. *A.tumefaciens* yang telah tumbuh diambil

Optimasi pertumbuhan eksplan pada media seleksi dilakukan untuk mengetahui konsentrasi optimal antibiotik *kanamycin* dan herbisida *phosphinothricin* yang dibutuhkan untuk menyeleksi tanaman transforman. Periode seleksi dilakukan sebanyak 5 periode, selama 21 hari disetiap periodenya.

Konfirmasi Keberadaan Konstruk Plasmid pCL4-*SoSPSI* dan pSMAB-*SoSPSI* pada *Agrobacterium tumefaciens*

Konfirmasi konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* dan pSMAB-*SoSPSI* dilakukan untuk mengetahui keberadaan konstruk plasmid pada *Agrobacterium* sebelum digunakan pada proses transformasi. Konfirmasi diawali dengan mengisolasi DNA plasmid menggunakan metode *alkaline lysis with SDS* (Sambrook *et al.*, 1989), yang selanjutnya hasil isolasi dijadikan sebagai DNA *template* pada analisis PCR (*polymerase chain reaction*).

Transformasi gen *SoSPS*

Transformasi gen *SoSPSI* dilakukan dengan menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 yang mengandung konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* atau pSMAB-*SoSPSI* (Gambar 1).

dengan menggunakan sentrifugasi 10.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Pellet yang didapat dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam 50 ml media infeksi (MS cair pH 5,5 + *acetosyringone* 100 mgL⁻¹) dan eksplan digojog dalam media infeksi selama 30 menit dalam kondisi gelap. Setelah proses infeksi, eksplan disaring pada kertas saring steril dan

pindahkan ke dalam media kokultivasi (MS + *acetosyringone* 100 mgL⁻¹).

Eliminasi *A. tumefaciens* dilakukan dengan mencuci eksplan yang telah diinfeksi dengan menggunakan antibiotik *cefotaxime* 500 mgL⁻¹. Seleksi dilakukan dengan menumbuhkan eksplan pada media *Murashige Skoog* (MS) yang mengandung antibiotik *kanamycin* atau herbisida *phosphinotricin*.

Eksplan yang mampu tumbuh dan berkembang pada media seleksi diaklimatisasi pada media tanah dalam rumah kaca, setelah berumur 1 bulan dilakukan analisa tanaman transforman.

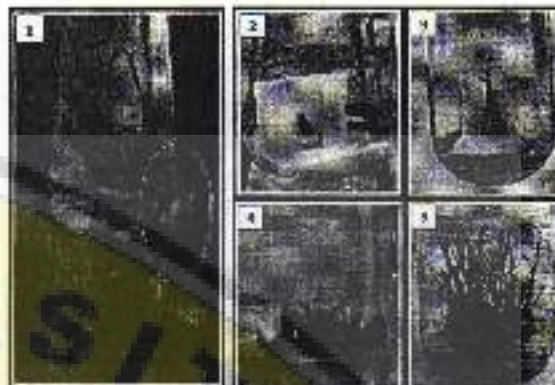
Analisa Tanaman Transforman

Analisa tanaman transforman diawali dengan melakukan isolasi DNA genom yang nantinya dijadikan sebagai template pada analisa PCR. Isolasi DNA genom dilakukan dengan menggunakan promega kit *DNA extraction*.

Analisis PCR dilakukan menggunakan pasangan primer gen *nptII* atau gen bar dengan sekuens primer *nptII* (*forward*) 5'-TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG-3' dan *nptII* (*reverse*) 5'-AGC CAA CGT ATG TCC TGAT-3' atau primer *bar* (*forward*) 5'-ATC GTC AAC CAC TAC ATC GAG AC-3' dan *bar* (*reverse*) 5'-CCA GCT GCC AGA AAC CCA CGT C-3'.

HASIL

Regenerasi Tunas Lateral Tebu Menjadi Tanaman Tebu *in vitro*



Gambar 3. Tahapan regenerasi tunas lateral tebu hingga menjadi tanaman tebu *in vitro*.

Tunas lateral tebu yang telah diisolasi dari tanaman tebu ditanam pada media MS dengan penambahan hormon 1,5 mgL⁻¹ BAP serta 0,1 mgL⁻¹ GA3 sesuai metode Safitri dan Sugiharto (2011), hal ini terbukti dapat meningkatkan multiplikasi tanaman tebu sehingga dapat mempercepat pertumbuhan dan menghasilkan anakan lebih banyak.

Optimasi Eksplan Pada Media Seleksi

Hasil optimasi eksplan pada media seleksi menunjukkan sensitivitas tanaman tebu *in vitro* terhadap antibiotik *kanamycin* dan herbisida *phosphinotricyn* ditunjukkan pada tabel 1. Antibiotik *kanamycin* pada konsentrasi 50 mgL⁻¹ telah mampu mematikan sel tanaman tebu *in vitro* pada periode seleksi ke-5. Sedangkan herbisida *phosphinotricyn* telah dapat mematikan seluruh sel tanaman tebu pada periode seleksi ke-3.

Tabel 1. Optimasi Eksplan Pada Media Seleksi

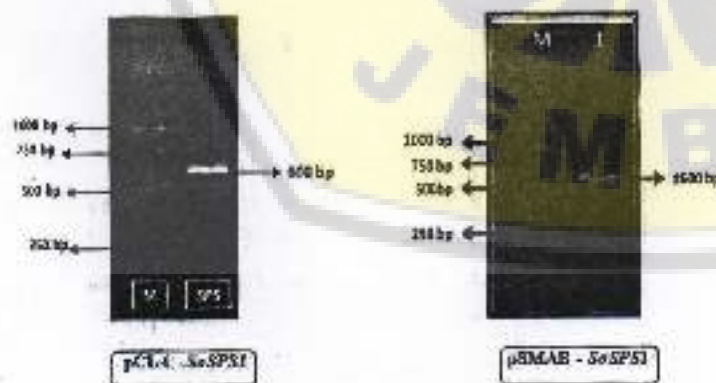
Agen seleksi	Konsentrasi (mgL ⁻¹)	∑ eksplan	S1	S2	S3	S4	S5
pCL4- <i>SoSPS1</i> (<i>Kanamycin</i>)	20	50	42	33	28	21	14
	30	50	40	28	20	14	8
	40	50	35	22	15	10	3
	50	50	30	18	12	7	-
pSMAB- <i>SoSPS1</i> (<i>Phosphinotricin</i>)	2	50	38	25	18	13	7
	3	50	30	22	15	10	5
	4	50	23	15	8	-	-
	5	50	18	10	-	-	-

Konfirmasi Konstruksi Plasmid pCL4-*SoSPS* dan pSMAB-*SoSPS*

Konstruksi plasmid pCL4 dan pSMAB mengandung gen *SoSPS* sebagai *gen of interest* (*goi*), promoter *Rice ubiquitin2* (*RUBQ2*). *Gen bar* sebagai *selectable marker* yang memiliki resistensi terhadap *phosphinotricin* (*PPT*) untuk pSMAB dan *nptII* sebagai *selectable marker* yang memiliki resistensi terhadap antibiotik *kanamycin*. Konfirmasi konstruksi plasmid pSMAB dilakukan dengan cara isolasi DNA plasmid dari *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 yang digunakan. Analisis *polymerase chain reaction* (*PCR*) dilakukan menggunakan

template plasmid yang diisolasi untuk membuktikan bahwa *Agrobacterium* telah tersisipi oleh plasmid pCL4 dan pSMAB yang membawa gen *SoSPS*.

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer, yaitu 2-*forward* SPS (2F) dan 2-*reverse* SPS (2R) untuk mengetahui keberadaan gen *SoSPS1*. Primer 2F/2R memiliki sekuens: SPS 2F (5'-GAT TCT GAT ACA GGT GGC CA -3'), primer SPS-2R (5'-TCC TGC CTT GTG CTC GTG AT -3') dan DNA yang teramplifikasi berukuran 600 basepair (bp).



Gambar 4. Hasil elektroforesis PCR produk DNA plasmid pCL4 dan pSMAB menggunakan pasangan primer F/R SPS; (M) DNA marker (*intron biotechnology 1 kb ladder*).

Hasil Transformasi gen *SoSPS1* dengan menggunakan Vektor *pCL4-SoSPS1* dan *pSMAB-SoSPS1*

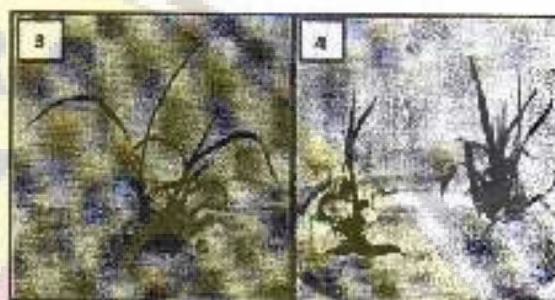
Tanaman yang putatif transforman yang dihasilkan dari transformasi menggunakan vektor *pCL4-SoSPS1* akan mampu beregenerasi pada media seleksi dan tidak terganggu proses metabolismenya, sedangkan tanaman non transforman akan mengalami kematian yang diawali dengan terganggunya metabolisme kloroplas, sehingga menyebabkan tanaman menjadi albino dan mati.



Gambar 5. Tanaman putatif transforman *pCL4-SoSPS1* (1), dan Tanaman non-transforman *pCL4-SoSPS1* (2).

Antibiotik *kanamycin* memiliki kemampuan untuk membuat organ tanaman yang tidak transforman menjadi etiolasi dan klorosis. Hal tersebut disebabkan protein yang dibutuhkan untuk biogenesis kloroplas terganggu sintesanya melalui pengikatan sub unit ribosom oleh antibiotik *kanamycin* sehingga proses translasi mRNA terganggu.

Transformasi dengan menggunakan vektor *pSMAB-SoSPS1* menunjukkan mekanisme lain. Tanaman non transforman akan mengalami nekrosis dan berakhir dengan kematian. Hal ini dikarenakan *phosphinotricyn* menghambat aktivitas dari enzim glutamine synthase yang bertugas untuk merubah ammonia menjadi asam glutamat, sehingga penghambatan tersebut menyebabkan kematian tanaman yang disebabkan akumulasi ammonia pada sel.



Gambar 6. Tanaman putatif transforman putatif transforman *pSMAB-SoSPS1* (3), dan Tanaman non-transforman *pSMAB-SoSPS1*(4).

Persentase Jumlah Eksplan Hasil Transformasi Pada Media Seleksi

Jumlah eksplan yang digunakan dalam transformasi sebanyak 50 tanaman tebu *in vitro*, dari jumlah tersebut didapatkan 6 tanaman putatif transforman *pCL4-SoSPS1*, dan 12 tanaman putatif transforman *pSMAB-SoSPS1* yang berhasil diuklimatisasi. Persentase masing-masing vektor adalah 12% untuk *pCL4-SoSPS1* dan 24 % untuk *pSMAB-SoSPS1* (tabel 1).

Tabel 2. Persentase eskplan pada media seleksi

Vektor	K	E	Media seleksi					A
			S (1)	S (2)	S (3)	S (4)	S (5)	
<i>pCL4</i>	50 100%	50 100%	39 78%	26 52%	19 38%	10 20%	6 12%	6 100%
<i>pSMAB</i>	50 100%	50 100%	31 62%	23 46%	18 36%	-	-	12 66,7%

Keterangan:

S : Seleksi (dilakukan selama 21 hari).
K : Kokultivasi (dilakukan selama 3 hari).
E : Eliminasi (dilakukan selama 7 hari)
A : Aklimatisasi

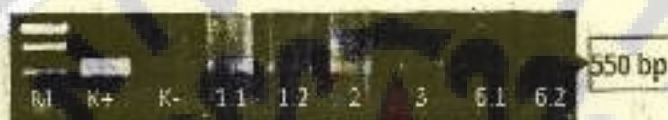
pCL4 : Agen seleksi antibiotik *Kanamycin*.
pSMAB : Agen seleksi herbisida
phosphinothricin.

Hasil Analisis PCR Tanaman Tebu Putatif Transforman

Analisis PCR dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen dalam genom tanaman, dan DNA genom didapatkan dari hasil isolasi genom semua tanaman putatif transforman yang telah

berhasil diaklimatisasi (Klon 1.1, klon 1.2, klon 2, klon 3, klon 6.1 klon 6.2)

Analisis PCR tanaman transforman dilakukan dengan menggunakan pasangan primer *nptII* yang memiliki sekuen primer *forward* (PF) (5'-TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG-3') dan *reverse* (PR) (5'-AGC CAA CGT ATG TCC TGAT-3') yang dapat mengamplifikasi fragmen DNA dengan ukuran panjang ± 550 bp.



Gambar 7. Agarose gel elektroforesis hasil PCR DNA genom daun tebu menggunakan pasangan primer *nptII*. M: 1 kb DNA ladder, K⁺: kontrol plasmid pCL4-*SoSPS1*, K⁻: tebu *wild type*, E_{1.1} – E_{6.2}: tanaman transforman tahan terhadap antibiotik kanamycin. Tanda panah menunjukkan pita DNA *nptII* yang teramplifikasi pada ukuran 550 bp.



Gambar 8. Analisis agarose gel elektroforesis hasil PCR DNA genom daun tebu menggunakan pasangan primer *bar*. M: 1 kb DNA ladder (Fermentas), K⁺: kontrol plasmid pSMAB-*SoSPS1*, K⁻: tebu *wild type*, E₁ – E₁₂: tanaman transforman tahan terhadap herbisida *phosphinothricin*.

KESIMPULAN

Efektifitas transformasi gen *SoSPS* dengan menggunakan plasmid pCL4-*SoSPS1* sebesar 12% sedangkan pSMAB-*SoSPS1* sebesar 2%. Hasil tersebut membuktikan bahwa transformasi gen *SoSPS1* menggunakan konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* dengan agen seleksi antibiotik *kanamycin* lebih efektif dibandingkan dengan menggunakan plasmid pSMAB-*SoSPS1* yang menggunakan herbisida *phosphinothricin*.

UCAPAN TRIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh Penelitian

Prioritas Nasional MP3EI (Masterplan Percepatan dan Perluasan Pembangunan Ekonomi Indonesia) tahun 2012 atas nama Prof. Dr. Bambang Sugiharto.

DAFTAR PUSTAKA

Huber, S.C. and J.L Huber. 1996. Role of Sucrose Phosphate Synthase in Sucrose Metabolism in Leaves. *Plant Physiol.* **89**:518-524.
Igasaki, T., Ishida Y., Mohri, T., Ichikawa, H., Shnohara, K. (2002). Transformation of *Populus Alba* and Direct Selection of Transformants With The Herbicide Bialaphos. *Bulletin of FPPRI.* **1**: 235-240.

- Laporte, M., Julie A. Galagan., Amy L. Prasch., Peter J. Vanderveer., David T. Hanson., Christine K. Shewmaker., Thomas D. Sharkey. 2001. Promoter Strength and Tissue Specificity Effects on Growth of Tomato Plants Transformed With Maize Sucrose-Phosphate Synthase. *Planta*. **212**: 817-822.
- Liu D., S.V. Oard, and J.H. Oard, 2003. High Transgene Expression Levels in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by The Rice Ubiquitin Promoter RUBQ2. *Plant Science* **165**:743-750.
- Salitri dan Sugiharto, 2011. A Comparison Study For Agrobacterium-mediated transformation Method in Sugarcane (*Saccharum spp* L.). *Jurnal ILMU DASAR*. Vol. **12**. No. 2: 140-147.
- Setyati, S., P. Okviandari., M. Hazmi., B. Sugiharto. 2007. Studi Perbandingan Metode Transformasi DNA Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum hybrid*). *Berk. Penel. Hayati*. **13**: 39-44.

